

酵母双杂交筛选华北大黑鳃金龟触角均一化 cDNA 文库

王 冰, 尹 姣, 李克斌, 曹雅忠*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 昆虫错综复杂的嗅觉系统在昆虫寻找寄主、交配、产卵以及逃避行为中起到了至关重要的作用。因此, 对昆虫嗅觉感受机理的研究将有助于揭开昆虫感受和识别环境中的气味物质并引起相关行为反应的秘密。为了更多地了解华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* Faldermann 嗅觉相关蛋白互作机制, 本实验利用 DUALhunter Starter Kits 酵母双杂交筛选试剂盒, 构建了华北大黑鳃金龟气味结合蛋白 OBP2 诱饵载体, 筛选了华北大黑鳃金龟触角酵母双杂交系统均一化的 cDNA 文库。通过 β -半乳糖苷酶活性检测以及 GenBank 中 Blast 比对分析, 以 OBP2 为诱饵鉴定出 6 个阳性互作物。我们推测其中的一种较强的阳性互作物凝固酶原可能是华北大黑鳃金龟在嗅觉识别过程中的相关蛋白。

关键词: 华北大黑鳃金龟; 气味结合蛋白; 蛋白互作; 酵母双杂交; 文库筛选

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2013)10-1127-08

Screening of the normalized cDNA library from *Holotrichia oblita* (Coleoptera: Scarabaeida) antennae using yeast two-hybrid system

WANG Bing, YIN Jiao, LI Ke-Bin, CAO Ya-Zhong* (State key laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pest, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The sophisticated olfactory system of insects plays a crucial role in their behaviors, such as host seeking, mating, oviposition, as well as escaping behaviors. Therefore, the mystery of arousing a series of insect behavior reactions by perceiving and distinguishing odorants in the environment will be unveiled by investigating olfactory receptive mechanism. In order to clarify the mechanism of interaction between olfactory associated proteins in *Holotrichia oblita* Faldermann, the HoblOBP2 bait was constructed using DUALhunter Starter Kits. Then, the normalized cDNA library from *H. oblita* antennae was screened. By detecting β -galactosidase activity and the Blast analysis in GenBank, six interactors were identified using HoblOBP2 bait. We inferred that the proclotting enzyme is the strongest positive interactor, which might play a role in the process of olfactory recognition.

Key words: *Holotrichia oblita*; odorant binding proteins; protein interaction; yeast two-hybrid system; library screening

气味结合蛋白 (odorant-binding proteins, OBPs) 是外部环境与触角嗅觉感器内气味受体的媒介 (Leal, 2005)。根据氨基酸序列差异, 气味结合蛋白分为 3 类, 即普通气味结合蛋白 (general odorant-binding proteins, GOBPs)、性信息素结合蛋白 (pheromone-binding proteins, PBPs) 和触角结合蛋白 X (antennal binding protein X, ABPX) (Pelosi *et al.*, 2006)。自从气味结合蛋白受到广泛研究以来, 对

于其功能的假说或模式不断地被提出。目前, 一种嗅觉识别假说得到了广泛的认可, 即气味分子通过昆虫嗅觉感器表皮的小孔进入触角感器, 与气味结合蛋白相结合, 共同穿过树突外的嗅觉感器淋巴液, 最终激活膜结合受体 (Leal, 2013)。

先前的一些研究发现了 OBPs 新的功能, 即冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的 OBPs 能够形成二聚体, 为嗅觉识别的分子机制提供了新的依据

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000853); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003025)

作者简介: 王冰, 女, 1983 年生, 河北宣化人, 博士, 研究方向为昆虫生理与分子生物学, E-mail: cutebbz@hotmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yzcao@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2013-05-12; 接受日期 Accepted: 2013-09-03

(Andronopoulou *et al.*, 2006; Wogulis *et al.*, 2006; Qiao *et al.*, 2011)。除了在冈比亚按蚊 *A. gambiae* 的研究中发现气味结合蛋白能够形成二聚体以外, 在其他一些研究中也找到一些证据 (Campanacci *et al.*, 1999; Danty *et al.*, 1999; Sandler *et al.*, 2000; Plettner *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2003; Honson *et al.*, 2003)。但是这些都不足以证明在活体内蛋白是否真正地以这种形式运作, 亦或是在其他昆虫中是否也存在气味结合蛋白二聚体的形式。因此, 还需要进一步的研究和验证。

华北大黑鳃金龟 *Holotrichia obliata* Faldermann 气味结合蛋白 OBP2 属于经典型 OBPs 类群, 是可溶性的酸性小分子蛋白 (Deng *et al.*, 2012)。对 HoblOBP2 结构的研究显示, 其中含有 6 个 α 螺旋, 能够形成疏水结合口袋, 通过范德华力和疏水作用与气味分子相结合 (庄绪静等, 2013)。蛋白体外表达后的功能分析发现, HoblOBP2 定位于华北大黑鳃金龟触角中的板形和锥形感器中, 并能与一些植物挥发物结合 (Deng *et al.*, 2012)。虽然现在对 HoblOBP2 结构和功能的研究已经取得了一些进展, 但是这种可溶性的蛋白是如何参与嗅觉刺激的识别和编码这样的中心问题还没有说服力的答案。

酵母双杂交技术是在真核细胞中检测蛋白质与蛋白质之间的相互作用的方法 (Fields and Song, 1989)。随后发展起来的基于分裂泛素的酵母双杂交系统可用于检测细胞质内蛋白以及膜蛋白之间的相互作用 (Johnsson and Varshavsky, 1994)。目前为止, 它已经被成功地应用于 cDNA 文库的筛选 (Thaminy *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Matsuda *et al.*, 2005; Pasch *et al.*, 2005; Felkl and Leube, 2008)。本实验通过构建华北大黑鳃金龟气味结合蛋白 OBP2 诱饵载体, 利用基于分裂泛素系统的酵母双杂交技术, 筛选华北大黑鳃金龟均一化 cDNA 文库, 以期获得与气味结合蛋白互作的蛋白, 为华北大黑鳃金龟嗅觉识别的分子机制提供新的理论依据, 为嗅觉蛋白互作研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

本实验所用的酵母双杂交筛选试剂盒 DUALhunter Starter Kits 中的主要载体包括: 诱饵载体 pDHB1 Vector、文库/猎物载体 pPR3-N Vector、

对照诱饵载体 pDHB1-largeT Control Vector、对照猎物载体 pDSL- Δ p53 Control Vector、功能反应对照载体 pOst1-NubI Control Vector。酵母菌株为 NMY51。

1.2 培养基和主要试剂

均一化文库构建试剂盒 EasyClone Normalized cDNA Library Construction Package, 酵母双杂交筛选试剂盒 DUALhunter Starter Kits, 酵母转化试剂盒 (DSY Yeast Transformation Kit), β -半乳糖苷酶检测试剂盒 HTX (β -galactosidase Assay Kit), 培养基 Media Starter Package1, Mouse anti LexA antibody 均购自 Dualsystems Biotech 公司。限制性内切酶 *Sfi*I 购自大连宝生物工程有限公司。酵母质粒小提试剂盒购自天根生化科技有限公司。酸洗玻璃珠购自 Sigma 公司。测序由华大基因生物技术公司完成。

1.3 诱饵载体的构建

所有 DUALhunter 系统的载体上有 *Sfi*I 限制性内切酶的酶切位点: GGCCATTA'CGGCC 和 GGCCG CCT'CGGCC。使用标准的克隆程序将华北大黑鳃金龟 OBP2 的开放阅读框序列 (GenBank 登录号: GQ856257) 克隆到诱饵载体 pDHB1 上。转化质粒到大肠杆菌, 用限制性内切酶酶切和测序检测插入序列正确性。引物序列如下: 正向引物: 5'-TTTCTGCACAATATTTCAAGC-3'; 反向引物: 5'-GTAAGGTGGACTCCTTCT-3'。

1.4 诱饵转入酵母菌株 NMY51 进行表达验证

采用 LiAc 转化法将诱饵载体、阳性对照 pDHB1-largeT 和阴性对照 pPR3-N 分别转入报告菌株 NMY51, 根据载体抗性不同分别将其涂布于 SD/-Leu (SD-L) 和 SD/-Trp (SD-W) 平板, 30℃ 培养 4 d。使用 LexA 小鼠单克隆抗体通过免疫印迹杂交验证诱饵表达情况。

1.5 DUALhunter 系统的功能验证

从新鲜酵母 NMY51 平板上挑取几个菌落接种于 50 mL YPAD 液体培养基中, 30℃ 振荡过夜培养。参照 1.4 节中的酵母转化法进行转化, 转化反应设置见表 1。将每个转化产物分别涂布于 SD/-Trp/-Leu (SD-LW), SD/-Trp/-Leu/-His (SD-HLW) 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (SD-AHLW) 平板上, 30℃ 培养 4 d。计算所有平板菌落数以及选择性平板与非选择性平板上的生长百分率。生长百分率 (%) = 选择平板上克隆的数量 $\times$ 100/非选择平板上克隆的数量。

表 1 功能分析的转化反应
Table 1 Transformation reaction of functional assay

反应 Reaction	用量(μg) Amount	质粒 1 Plasmid 1	质粒 2 Plasmid 2
1	1.5	Bait construct	pOst1-NubI
2	1.5	Bait construct	pPR3-N
3	1.5	pDHB1-LargeT	pDSL-Δp53
4	1.5	pDHB1-LargeT	pPR3-N

1.6 用 3-AT 优化筛选的条件

3-AT 筛选模拟了文库筛选的条件，于 SD-HLW 和 SD-AHLW 选择性培养基中添加不同的 3-AT 浓度，即 0，1，2.5，5，7.5 和 10 mmol/L 等，并将诱饵载体 pDHB1-OBP2 和文库载体 pPR3-N 共同转化于不同 3-AT 浓度的 SD-HLW 和 SD-AHLW 平板上培养，以获得最佳筛选背景。

1.7 均一化文库构建及鉴定

提取华北大黑鳃金龟触角总 RNA，经 PCR 扩增获得 dscDNA 后进行杂交以及均一化的 NORMALIZER enzyme 处理，再次经过两轮 PCR 扩增以及 cDNA 片段分级后，将 cDNA 克隆到文库载体 pPR3-N 上并转化大肠杆菌得到初始文库。检测初始文库滴度，并且随机挑取多个文库克隆进行文库多态性分析。

1.8 筛选华北大黑鳃金龟触角均一化 cDNA 文库

参照 1.4 节中的转化方法，将诱饵质粒 pDHB1-OBP2 和文库质粒 pPR3-N-Library 共转化于新鲜酵母菌 NMY51 中，将细胞涂布于准备好的最优 3-AT 浓度的选择平板，每个直径为 150 mm 的平板上涂布 300 μL 重悬细胞。余下的细胞悬液用 0.9% 氯化钠按体积比 1:100，1:1000 和 1:10 000 的比例稀释，每个稀释比例取 100 μL 涂到直径为 100 mm 的 SD-LW 平板上，30℃ 培养 4 d，用于计算转化效率。总转化数 = SD-LW 平板上的菌落数 × 稀释倍数 × 10 × 4.8。

1.9 候选阳性克隆的鉴定

相互作用的蛋白鉴定之后，分离编码互作物的文库质粒。从酵母菌中提取质粒的步骤参照酵母质粒小提试剂盒的说明书。从酵母中提取的质粒转化大肠杆菌中，用标准的方法分离鉴定互作的克隆。菌液 PCR 检测插入片段的大小或用限制性内切酶 *Sfi* I 酶切所有小量制备质粒以检测每个互作子克隆插入片段的大小。测序鉴定筛选的候选互作子。用 NCBI 中的 Blast 工具对测序结果进行同源性搜索，

并分析所获得的克隆编码蛋白的信息。

1.10 β-半乳糖苷酶活性检测以及回转变证

根据 DUALsystem Biotech 公司的 HTX β-galactosidase Assay Kit 试剂盒的说明，对候选阳性互作组进行 β-半乳糖苷酶活性检测，以评估在文库筛选中个体转化作用的强度。将候选阳性互作组再次共转化并进行 β-半乳糖苷酶活性检测，从而进一步确定与诱饵蛋白相互作用的阳性互作物。

2 结果与分析

2.1 均一化文库质量检测

本实验测得文库初始库容量约为 1.1×10^6 个克隆数。随机选择 23 个阳性克隆进行菌液 PCR，经琼脂糖凝胶电泳检测，如图 1 结果显示，插入进文库载体的 DNA 片段在 400 ~ 3 000 bp 之间，且有多态性，可用于酵母双杂交筛选。

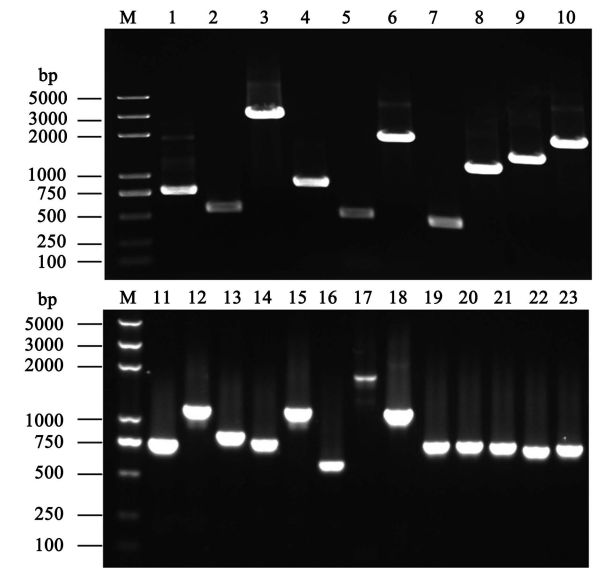


图 1 插入文库载体的 cDNA 片段大小
Fig. 1 Fraction size of cDNA ligated into library vector
M: *Trans2K Plus* DNA Marker; 1 – 23: 随机挑选的 23 个阳性克隆
Randomly selected 23 positive clones.

2.1 诱饵载体的构建及表达验证

本实验利用华北大黑鳃金龟气味结合蛋白 OBP2 为诱饵，首先获取带有 *Sfi* I 限制性内切酶酶切位点的 OBP2 的开放阅读框序列，大小为 489 bp，定向克隆到诱饵载体 pDHB1 上，获得诱饵表达载体 pDHB1-OBP2。如图 2 所示用限制性内切酶酶切、菌液 PCR 检测其序列正确。测序结果显示，

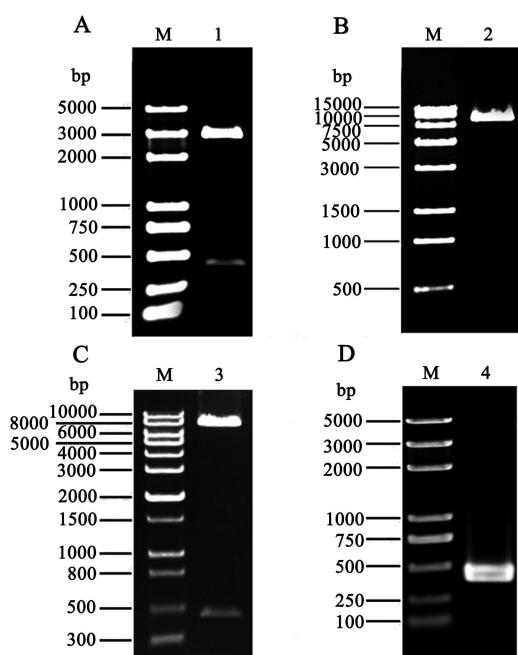


图2 HoblOBP2 诱饵载体的构建

Fig. 2 Construction of HoblOBP2 bait vector

A: 酶切鉴定 Enzyme digestion. M: *Tran2K™* Plus DNA Marker; 1: pGEM-T-OBP2 酶切鉴定 Enzyme digestion of pGEM-T-OBP2; B: 酶切鉴定 Enzyme digestion. M: *Trans15K* DNA Marker; 2: pDHB1 酶切鉴定 Enzyme digestion of pDHB1; C: 酶切鉴定 Enzyme digestion. M: *Trans15K* DNA Marker; 3: pDHB1-OBP2 酶切鉴定 Enzyme digestion of pDHB1-OBP2; D: 菌液 PCR 鉴定 PCR analysis. M: *Tran2K™* Plus DNA Marker; 4: pDHB1-OBP2 菌液 PCR 分析 PCR analysis of pDHB1-OBP2.

OBP2 基因无突变, 说明诱饵载体构建成功。

将构建好的诱饵载体 pDHB1-OBP2、阳性对照 pDHB1-largeT 和阴性对照 pPR3-N 分别转入酵母菌 NMY51 中, 30℃ 培养 4 d, 每个平板均长出 300 ~ 500 个菌落, 这取决于转化效率的高低。用 Western blot 杂交检测诱饵表达, 本实验 Western blot 杂交检测的阳性对照 pDHB1-largeT 分子量为 114 kDa (图 3 泳道 3), 阴性对照 pPR3-N 不表达, 图 3 泳道 1 未见条带。诱饵融合蛋白的分子量如图 3 泳道 2 所示, 约为 52 kDa, 即诱饵蛋白 OBP2 的分子量 (14 kDa) 与 Cub-LexA-VP16 融合蛋白 (38 kDa) 之和, 说明诱饵正确表达。

2.2 DUALhunter 系统的功能验证

系统的功能验证设置了 4 组共转化, 分别是诱饵 pDHB1-OBP2 与 pOst1-NubI、诱饵 pDHB1-OBP2 与空的文库载体 pPR3-N、阳性对照 pDHB1-LargeT 与 pDSL-Δp53、阴性对照 pDHB1-LargeT 与 pPR3-N。共转化后, 30℃ 培养 4 d, 每个平板长出菌落的

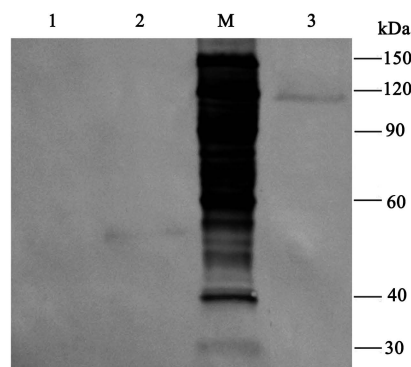


图3 诱饵载体表达验证

Fig. 3 Expressed verification of the bait vector

M: *EasySee™* II Western Marker; 1: 阴性对照 pPR3-N 的表达 Expression of the negative control pPR3-N; 2: 诱饵 pDHB1-OBP2 的表达 Expression of the bait vector pDHB1-OBP2; 3: 阳性对照 pDHB1-largeT 的表达 Expression of the positive control pDHB1-largeT.

情况见表 2, 阳性对照 pDHB1-LargeT 与 pDSL-Δp53 在 SD-HLW 和 SD-AHLW 平板上有生长 (反应 3), 阴性对照在相同平板上未见生长 (反应 4)。诱饵 pDHB1-OBP2 与 pOst1-NubI 在 SD-HLW 和 SD-AHLW 平板上有菌落生长, 生长百分率分别为 89.0% 和 72.4% (反应 1), 与空的文库载体 pPR3-N 在 SD-HLW 和 SD-AHLW 平板上同样有菌落生长, 生长百分率分别为 82.0% 和 79.1% (反应 2), 这说明共转化效率较高但系统有自激活效应, 需进行 3-AT 筛选从而降低假阳性出现的机率。本实验利用 OBP2 为诱饵筛选 3-AT 时, 测得总转化数为 9.12×10^6 cfu, 保证了 3-AT 筛选的严谨性。筛选结果显示, SD-AHLW/25 mmol/L 3-AT 为最优文库筛选条件。

2.3 筛选华北大黑鳃金龟触角均一化 cDNA 文库

利用 OBP2 为诱饵, 在 SD-AHLW/25 mmol/L 3-AT 的条件下, 筛选 cDNA 文库, 测得总转化数为 1.2×10^7 cfu, 获得了较大的转化效率, 为文库筛选奠定基础。筛选到候选的阳性克隆再次于 SD-AHLW/25 mmol/L 3-AT 的条件下重新划线培养。

从二次筛选的候选阳性克隆中提取了 405 个质粒, 进行了 PCR 验证, 选择大小不同的片段, 重新转入大肠杆菌中, 并提取质粒, 筛选了 201 个克隆, 进行第 2 轮的菌液 PCR, 经测序分析鉴定出 12 个不同序列的候选阳性互作物, 并在 GenBank 中进行 Blast 比对分析, 除去未知序列后, 以 OBP2 为诱饵最终鉴定出 8 个候选阳性互作物 (表 3)。

表 2 DUALhunter 系统的功能验证
Table 2 The DUALhunter functional assay

反应 Reaction	质粒 1 Plasmid 1	质粒 2 Plasmid 2	二缺平板 SD-LW	三缺平板 SD-HLW	四缺平板 SD-AHLW
1	pDHB1-OBP2	pOst1-Nubl	+	+	+
2	pDHB1-OBP2	pPR3-N	+	+	+
3	pDHB1-LargeT	pDSL-Δp53	+	+	+
4	pDHB1-LargeT	pPR3-N	+	-	-

+: 有菌落生长 Colony growth; -: 无菌落生长 No colony growth.

表 3 OBP2 诱饵鉴定的候选阳性互作物
Table 3 Putative positive interactors screened by OBP2 bait

名称 Name	描述 Description	GenBank 登录号 GenBank accession no.
OBP21	翻译延伸因子(EF1G) Translation elongation factor-1 gamma, GST_N family, EFB1 gamma subfamily	AAL78751
OBP22	凝固酶原, 一种类似胰蛋白酶的丝氨酸蛋白酶 Proclotting enzyme, a trypsin-like serine protease	XP972628
OBP23	核糖体蛋白 L44e Ribosomal protein L44e	XP973623
OBP24	Split ends CG18497-PA, 一种 RNA 识别基序 Split ends CG18497-PA, a RNA recognition motif	XP972543
OBP25	类似转座子源性蛋白 4 Tigger transposable element-derived protein 4-like	XP001947105
OBP26	PHD 锌指蛋白 5A, 一种 PHF5 类似蛋白 PHD-finger 5A, a PHF5-like protein	XP967031
OBP27	Lark CG8597-PA, 一种 RNA 识别基序 Lark CG8597-PA, a RNA recognition motif	XP970745
OBP28	28S 核糖体 RNA 28S ribosomal RNA	GQ503347

2.4 β-半乳糖苷酶活性检测

筛选获得的 8 个候选阳性互作物, 还需通过 β-半乳糖苷酶活性检测, 以进一步确定诱饵和猎物蛋白之间相互作用。图 4 是这 8 个候选阳性互作物的

β-半乳糖苷酶活性检测, 其中每个互动组重复 3 次, 筛选到较强的候选阳性互作物有 OBP22 (proclotting enzyme)、OBP26 (PHD-finger 5A) 和 OBP27 (lark CG8597-PA)。

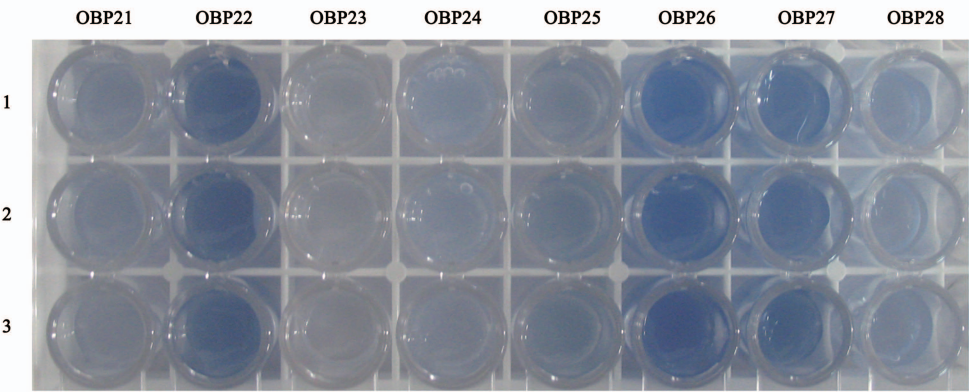


图 4 用 OBP2 为诱饵筛选到候选阳性互作物的 β-半乳糖苷酶活性检测
Fig. 4 β-Galactosidase assay of putative positive interactors screened by OBP2 bait

2.5 回转变证

将获得的候选阳性互作物 OBP21, OBP22, OBP23, OBP24, OBP25, OBP26, OBP27 和 OBP28

再次与诱饵 OBP2 共转化并进行 β-半乳糖苷酶活性检测, 最终得到表达 His, Ade 和 LacZ 的阳性克隆 6 个, 分别是凝固酶原 (proclotting enzyme)、RNA

识别基序 (split ends CG18497-PA)、类似转座子源性蛋白 4 (tigger transposable element-derived protein 4-like)、PHD 锌指蛋白 5A (PHD-finger 5A)、RNA 识别基序 (lark CG8597-PA) 和 28S 核糖体 RNA (28S ribosomal RNA)。

3 讨论

本实验的猎物蛋白是华北大黑鳃金龟触角均一化 cDNA 文库与突变的泛素 NubG 部分的融合蛋白, 诱饵蛋白是华北大黑鳃金龟气味结合蛋白 OBP2 与报告基因的表达融合。通过筛选文库, 确定与诱饵蛋白相互作用的胞质蛋白和核蛋白。构建好的诱饵载体转入酵母菌株 NMY51 后, 用 Western blot 检测诱饵表达情况。本实验用 Western blot 检测到了诱饵蛋白与 Cub-LexA-VP16 的融合蛋白。在某些情况下, 未能检测到诱饵蛋白的表达可能与酵母中融合蛋白的低效翻译或低效提取和/或在提取过程中的融合蛋白沉淀有关。如果通过免疫印迹方法无法检测诱饵蛋白, 则直接进行 DUALhunter 功能测定。在 DUALhunter 功能测定中, 如果诱饵正确表达并起作用, 在选择平板 SD-HLW 和 SD-AHLW 上的生长百分率应在 10%~100% 之间增长, 这取决于诱饵的表达水平, 即在选择条件下强劲增长说明诱饵表达较好。本实验中, 诱饵 pDHB1-OBP2 与 pOst1-NubI 在选择平板 SD-HLW 和 SD-AHLW 上的生长百分率分别为 89.0% 和 72.4%, 从功能检测结果来看诱饵蛋白表达情况较好。同时, 诱饵 pDHB1-OBP2 与空的猎物载体 pPR3-N 在选择性培养基上有菌落生长, 这说明系统有自激活效应, 需进行 3-AT 筛选, 以优化筛选条件, 从而降低假阳性出现的机率。为了找到最佳的 3-AT 浓度, 需在选择性平板 SD-HLW 和 SD-AHLW 上分别补充不同浓度的 3-AT。如果浓度过高, 则会缺失阳性克隆, 降低筛选的有效性; 如果浓度过低, 背景较强, 则假阳性出现的机率很高, 并且增加筛选的工作量。因此, 确定文库筛选的最佳背景条件对于高效筛选阳性克隆, 降低假阳性至关重要。

在文库筛选的过程中, 必须保证一定的转化效率。如果转化效率很低, 就会缺失许多阳性克隆, 造成文库筛选不全面。本实验利用 OBP2 为诱饵, 筛选华北大黑鳃金龟触角均一化 cDNA 文库, 测得总转化数为 1.2×10^7 cfu, 保证了文库筛选的有效性和可靠性。经生长报告基因 *HIS3* 和 *ADE2* 以及

颜色报告基因 *lacZ* 共同表达验证, 最终鉴定出 6 个阳性互作物。

气味结合蛋白是外部环境与触角嗅觉感器内气味受体的媒介 (Leal, 2005)。气味分子通过昆虫嗅觉感器表皮的小孔进入触角感器, 与气味结合蛋白结合, 共同穿过树突外的嗅觉感器淋巴液, 激活膜结合受体, 并刺激效应器, 最终调节门控离子通道的开放, 引发一系列的神经活动, 指导昆虫产生一系列的行为反应 (Rützler and Zwiebel, 2005)。嗅觉系统的动力学要求 OBPs 在释放气味分子激活膜结合受体后, 尤其是在膜结合受体是由配体单独激活的情况下, 需要气味分子迅速降解 (以毫秒级的速度) (Ishida and Leal, 2005)。然而, 关于信号终止 (也称为信号失活) 目前存在两种有争议的假说。第 1 种假说认为气味降解酶 (odorant-degrading enzymes, ODEs) 参与信息素的快速降解, 最终导致信号终止 (Ishida and Leal, 2005, 2008); 第 2 种假说认为, 存在一种现在还未知的清除物 (Kaissling, 2001; Kaissling and Leal, 2004), 承担分子陷阱的作用 (Ishida *et al.*, 2004), 清除气味分子, 终止信号转导。

研究 ODEs 的分子机制在基础生物学领域非常重要, 是害虫防治的新的分子靶标。大量的研究显示, ODEs, 尤其是触角专一性酯酶降解性信息素非常快以至于气味分子也被降解失活 (Ishida and Leal, 2005, 2008; Durand *et al.*, 2011)。如果酶降解理论成立, 那么这种酶需要存在于感器淋巴液中, 以降解气味分子 (Vogt, 2005)。然而, 我们也不能断定除了这种酶降解作用以外, 昆虫是否还以其他的分子机制降解气味分子。事实上, 昆虫嗅觉系统的动力学需要有一个“清理者”以失活性信息素或者气味分子的信号。例如, 对家蚕 BmorPBP1 的研究显示, 信号终止的分子机制可能是由于酶切割了 BmorPBP1 的 C 末端 (Kaissling, 2009)。

本实验筛选到的与 OBP2 发生相互作用较强阳性互作物凝固酶原, 属于类似胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶, 这些酶中的大多数在有限水解成活性形式的过程中是以无效前体酶原裂解合成的。凝固酶原是内毒素敏感的血淋巴凝血系统的丝氨酸蛋白酶的酶原。它是催化凝固蛋白原转变为不溶性凝胶的酶级联的组成部分, 被认为是血淋巴凝固系统中凝血酶原的部分 (Miyata *et al.*, 1984)。凝固酶原多肽 (轻链) 具有独一无二的二硫化结构域, 作为 B 因子、G 因子、上游激活子或者凝固蛋白原, 被酶作

用物等的识别位点行使功能。在轻链内有限的残基数量中,凝固酶原具有 O 连接和 N 连接的糖基化作用(Smith and DeLotto, 1992)。在昆虫气味识别过程中,ODEs 降解气味分子的理论假说通过在过去 30 年间的一些研究中受到了广泛的认可(Vogt, 2005)。一些体外实验显示,各种类型的性信息素能被触角内的醛氧化酶、醛脱氢酶、环氧化物水解酶、谷胱甘肽-S-转移酶以及细胞色素 P450s 氧化还原酶等降解(Vogt, 2005)。本实验研究发现 OBP2 与凝固酶原之间发生相互作用,推测该作用的发生可能与气味分子酶降解作用相关。

因此,为了深入研究嗅觉识别机制,本实验筛选到的阳性互作组,还需要进一步通过免疫共沉淀、GST Pull-down 技术,或荧光共振能量转移 FRET 等技术进行鉴定与验证,从而为更多地了解嗅觉相关蛋白的功能奠定基础。

参考文献 (References)

- Andronopoulou E, Labropoulou V, Douris V, Woods DF, Biessmann H, Iatrou K, 2006. Specific interactions among odorant-binding proteins of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 15: 797–811.
- Ban LP, Scaloni A, D' Ambrosio C, Zhang L, Yan YH, Pelosi P, 2003. Biochemical characterisation and bacterial expression of an odorant-binding protein from *Locusta migratoria*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 390–400.
- Campanacci V, Longhi S, Nagnan-Le Meillour P, Cambillau C, Tegoni M, 1999. Recombinant pheromone binding protein 1 from *Mamestra brassicae* (MbrPBP1). *European Journal of Biochemistry*, 264: 707–716.
- Danty E, Briand L, Michard-Vanhee C, Perez V, Arnold G, Gaudemer O, Huet D, Huet JC, Ouali C, Masson C, Pernollet JC, 1999. Cloning and expression of a queen pheromone-binding protein in the honeybee: an olfactory specific, developmentally regulated protein. *Journal of Neuroscience*, 19: 7468–7475.
- Deng SS, Yin J, Zhong T, Cao YZ, Li KB, 2012. Function and immunocytochemical localisation of two novel odorant-binding proteins in olfactory sensilla of the scarab beetle *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae). *Chemical Senses*, 37: 141–150.
- Durand N, Carot-Sans G, Bozzolan F, Rosell G, Siaussat D, Debernard S, Chertemps T, Maibèche-Coisne M, 2011. Degradation of pheromone and plant volatile components by a same odorant-degrading enzyme in the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *PLoS ONE*, 6: e29147.
- Felkl M, Leube RE, 2008. Interaction assays in yeast and cultured cells confirm known and identify novel partners of the synaptic vesicle protein synaptophysin. *Neuroscience*, 156: 344–352.
- Fields S, Song OK, 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245–246.
- Honson N, Johnson MA, Oliver JE, Prestwich GD, Plettner E, 2003. Structure-activity studies with pheromone binding proteins of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Chemical Senses*, 28: 479–489.
- Ishida Y, Chen AM, Tsuruda JM, Cornel AJ, Debboun M, Leal WS, 2004. Intriguing olfactory proteins from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Naturwissenschaften*, 91: 426–431.
- Ishida Y, Leal WS, 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 14075–14079.
- Ishida Y, Leal WS, 2008. Chiral discrimination of the Japanese beetle sex pheromone and a behavioral antagonist by a pheromone-degrading enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 9076–9080.
- Johnsson N, Varshavsky A, 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 10340–10344.
- Kaissling KE, 2001. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model. *Chemical Senses*, 26: 125–150.
- Kaissling KE, 2009. Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model revised. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 195: 895–922.
- Kaissling KE, Leal WS, 2004. Biologische Nanokapseln für Duftstoffe. *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 57: 66–71.
- Leal WS, 2005. Pheromone reception. *Topics in Current Chemistry*, 240: 1–36.
- Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58: 373–391.
- Matsuda S, Giliberto L, Matsuda Y, Davies P, McGowan E, Pickford F, Ghiso J, Frangione B, D' Adamio L, 2005. The familial dementia BRI2 gene binds the Alzheimer gene amyloid-beta precursor protein and inhibits amyloid-beta production. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 28912–28916.
- Miyata T, Hiranaga M, Umezumi M, Iwanaga S, 1984. Amino acid sequence of the coagulogen from *Limulus polyphemus* hemocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 8924–8933.
- Pasch JC, Nickelsen J, Schünemann D, 2005. The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions. *Applied Microbiology Biotechnology*, 69: 440–447.
- Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvillo M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 1658–1676.
- Plettner E, Lazar J, Prestwich EG, Prestwich GD, 2000. Discrimination of pheromone enantiomers by two pheromone binding proteins from the gypsy moth *Lymantria dispar*. *Biochemistry*, 39: 8953–8962.
- Qiao HL, He XL, Schymura D, Ban LP, Field L, Dani FR, Michelucci E, Caputo B, Torre A, Iatrou K, Zhou JJ, Krieger J, Pelosi P, 2011. Cooperative interactions between odorant-binding proteins of *Anopheles gambiae*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68: 1799–1813.
- Rüttler M, Zwiebel LJ, 2005. Molecular biology of insect olfaction;

- recent progress and conceptual models. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural and Behavioral Physiology*, 191: 777 – 790.
- Sandler BH, Nikonova L, Leal WS, Clardy J, 2000. Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex. *Chemistry and Biology*, 7: 143 – 151.
- Smith CL, DeLotto R, 1992. A common domain within the proenzyme regions of the *Drosophila* snake and easter proteins and *Tachypleus* proclotting enzyme defines a new subfamily of serine proteases. *Protein Science*, 1(9): 1225 – 1226.
- Thaminy S, Auerbach D, Arnoldo A, Stagljar I, 2003. Identification of novel ErbB3-interacting factors using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. *Genome Research*, 13: 1744 – 1753.
- Vogt RG, 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology Endocrinology*. Elsevier Academic Press, London. 753 – 804.
- Wang B, Pelletier J, Massaad MJ, Herscovics A, Shore GC, 2004. The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Molecular and Cell Biology*, 24: 2767 – 2778.
- Wogulis M, Morgan T, Ishida Y, Leal WS, Wilson DK, 2006. The crystal structure of an odorant binding protein from *Anopheles gambiae*: evidence for a common ligand release mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339: 157 – 164.
- Zhuang XJ, Yin J, Li KB, Cao YZ, 2013. Bioinformatics analysis of the odorant-binding protein HoblOBP2 in olfactory sensilla of the scarab beetle *Holotrichia oblita*. *Plant Protection*, 39(1): 50 – 55. [庄绪静, 尹姣, 李克斌, 曹雅忠, 2013. 华北大黑鳃金龟气味结合蛋白 HoblOBP2 的生物信息学分析. 植物保护, 39(1): 50 – 55]
- (责任编辑: 赵利辉)